

DOI:10.11931/guihaia.gxzw201811025

夏枯草 *PvDXS* 基因的克隆和表达分析¹李璐¹, 董诚明^{1,2}, 张梦佳¹, 朱昀昊^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

摘要: 在夏枯草转录组测序的基础上设计特异引物, 采用逆转录 PCR 技术获得该基因的全长核苷酸序列, 并进行生物信息学分析, 采用 qRT-PCR 法分析 *PvDXS* 在夏枯草不同组织及不同外源性物质诱导下的表达量。克隆得到的 *PvDXS* 基因开放阅读框 2 181 bp, 编码 726 个氨基酸, 理论分子量为 78 040.47 D, 等电点为 6.75, *PvDXS* 蛋白具有 Transketolase_C 结构域和 Transket_pyr 结构域, 系统进化树结果表明, *PvDXS* 蛋白与丹参、长春花的 DXS (SmDXS2、CrDXS2) 亲缘关系较近, 推测 *PvDXS* 属于第 II 类 DXS 蛋白。qRT-PCR 分析表明, *PvDXS* 基因在叶中表达量高于果穗及茎。对果穗施加 7 种外源性物质处理 24 h 后, GA₃ 处理组该基因表达量升高, 其它 6 种外源性物质处理后表达量均降低, 其中 CaCl₂、SNP、SA 处理后该基因的表达量显著降低。*PvDXS* 基因在不同组织中表达量差异较大, 且受外源物质诱导表达, 该研究结果为进一步研究 *PvDXR* 基因对夏枯草萜类成分合成途径中的功能及表达调控奠定基础。

关键词: 夏枯草, *PvDXS* 基因, 基因克隆, 表达分析

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Cloning and expression analysis of *PvDXS* gene from *Prunella vulgaris*

LI Lu¹, DONG Chengming^{1,2}, ZHANG Mengjia¹, ZHU Yunhao^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2.

Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine

Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603232); 国家重点研发计划(2017YFC1702800); 河南中医学院博士科研基金(BSJJ2015-13)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (81603232); the National Key Research and Development Program of China(2017YFC1702800) ; Doctoral Research Fund of Henan University of Traditional Chinese Medicine (BSJJ2011-07)]。

作者简介: 李璐 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源的开发利用, (E-mail) 15039087195@163.com。

***通信作者:** 朱昀昊, 博士, 讲师, 主要从事药用植物分子生物学研究, (E-mail)guxinhan123@163.com。

Abstract: Specific primers were designed on the basis of transcriptome sequencing of *Prunella vulgaris*. The full-length nucleotide sequence of *PvDXS* was obtained by reverse transcription PCR and the bioinformatics analysis of the gene was conducted. The expression levels of *PvDXS* in different tissues and exogenous substances were detected by real-time quantitative PCR. The cDNA sequence of *PvDXS* contained the open reading frame which has 2181 bp and encoded a predicted protein of 726 amino acids with a theoretical molecular weight of 78040.47 D and a isoelectric point of 6.75. The protein has Transketolase_C domain and Transket_pyr domain. Phylogenetic tree results showed that *PvDXS* protein was closely related to *DXS* (*SmDXS2*, *CrDXS2*) from *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Catharanthus roseus*, and it was inferred that *PvDXS* belonged to the class II *DXS* protein type. Tissue expression pattern analysis revealed that *PvDXS* gene in leaves was higher than that in ears and stems. After treated with 7 exogenous substances for 24h, the expression of the gene increased in GA_3 treatment group and decreased after treatment with the others. The expression level of the gene decreased significantly after $CaCl_2$, SNP and SA treatment. The expression of *PvDXS* was variant in different tissues and varied greatly after treatment of exogenous substances, which laid a foundation for further study on the function and expression regulation of *PvDXS* in the synthesis pathway of terpenoid components of *Prunella vulgaris*.

Keywords: *Prunella vulgaris*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene, gene clone, expression analysis

DXS 是一种转酮酶可催化非甲羟戊酸途径(DXP 途径), 在硫胺素焦磷酸(thiamin pyrophosphate, TPP)作用下, 该酶使丙酮酸脱羧后, 与磷酸甘油醛缩合形成 DXP(王凌健等, 2013)。研究表明, *DXS* 定位于植物质体的类囊体(Rodriguez-Concepcion & Albert, 2015)。该酶具有 3 个功能结构域: TPP 结合结构域、转酮醇酶结构域和嘧啶结合结构域, 且在其 N 端有一段质体转运肽(Jadaun et al., 2017)。Querol et al.(2001)报道了在酸性介质中采用高效液相色谱法测定 *DXS* 酶活性。作为萜类化合物合成的重要限速酶, 克隆得到 *DXS* 基因, 对于研究萜类化合物生物合成途径具有重要意义, 目前其他植物中 *DXS* 基因表达、调控和遗传转化等方面已有部分研究(张浩宇等, 2018), 而关于夏枯草 *DXS* 基因的研究报道较少。

夏枯草(*Prunella vulgaris*)为唇形科草本植物, 以其干燥果穗入药, 具清肝明目、消肿散结等功效, 其中萜类化合物是其重要的活性成分。Sun et al. (2014)发现熊胆草中 *DXS* 的组织表达模式与二萜物质苦蒿素的组织积累模式呈正相关, 暗示过表达 *DXS* 基因可能会增

加熊胆草中二萜物质苦蒿素的合成。Gong et al. (2006) 研究发现银杏 DXS 基因受到 MeJA 和 ASA 等外源物质调控。因此基于前期获得的夏枯草转录数据库基础上, 本研究采用 RT-PCR 技术从夏枯草中克隆得到 DXS 基因, 并对其进行生物信息学、组织表达模式及诱导表达分析。以期为进一步揭示该基因在夏枯草萜类代谢机制中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

夏枯草样品采自河南省确山县夏枯草 GAP 种植基地, 河南中医药大学董诚明教授鉴定为夏枯草(*Prunella vulgaris*, PVL)。

总 RNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司), 反转录试剂盒(Thermo 公司), 荧光定量试剂盒(QIAGEN), DNAMarker(TaKaRa 公司), PCR 产物回收试剂盒(上海生工), PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司 C1000 Touch Thermal Cycler), 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司 Step One Plus)。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 第一条链的合成

利用康为世纪植物 RNA 提取试剂盒提取夏枯草不同组织的总 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性。cDNA 的合成步骤按照 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行操作, 置于-20 ℃ 备用。

1.3 cDNA 全长克隆

从转录组数据库中得到的夏枯草 DXR 基因序列两端非编码区设计一对特异性引物 (DXR-F, DXR-R)(表 1), 以夏枯草叶片 cDNA 为模板, 进行扩增: cDNA 2.0 μL, 2 × Es Taq mix 10.0 μL, 10.0 μmol L⁻¹ 正反向引物各 1.0 μL, dd H₂O 6.0 μL 至体积为 20.0 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 1 min; 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 将扩增的目的条带切胶回收纯化, 并连接到 pMD19-T 载体上, 蓝白斑筛选, 菌落经 PCR 检测后的阳性克隆送往三博远志生物技术有限公司测序进行测序。组成型表达的 actin 基因 (KJ010818) 作为内参。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primer used for the study		
基因名称	引物序列 (5' to 3')	用途
Gene naming	Primer sequence (5' to 3')	Using
DXS-F	5'-ATGTCATCGTCTTGTGGAGTTATC-3'	基因克隆 Gene cloning
DXS-R	5'-ATGTTTCGTCTTGTGGAGTT--3'	

qDXS-F	5'-CTTGCTCAAGGCTCCAACGG-3'	荧光定量 PCR Real-time PCR
qDXS-R	5'-GCCGGATTCTCGACTCCAA-3'	
qactin-F	5'-GACCAGCTCTGCTGTGGAGA-3'	荧光定量内参基因
qactin-R	5'-ATGGCTGGAAGAGGACCTCAG-3'	Fluorescence quantitative
		reference gene

1.4 生物信息学分析

运用在线工具对 *PvDXS* 基因及编码蛋白进行生物信息学分析。利用 ORF finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) 在线软件分析开放阅读框;运用 DNAMAN 软件翻译目的基因氨基酸序列, 比对同源蛋白的序列; ExPASy Proteomics Server Protparam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析目的蛋白的理化性质; SinalP4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析目的蛋白功能域。NPSA server ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sop ma.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sop_ma.pl)) 预测蛋白质二级结构; Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白质三级结构; BaCello (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>) 和 ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 预测细胞定位和叶绿体转运肽切割位点。运用 MEGA5.1 软件对目的基因及同源基因的氨基酸序列构建进化树分析。

1.5 夏枯草 *DXS* 基因的特异性表达分析

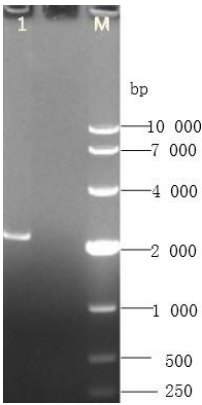
夏枯草生长旺盛期, 对生长状态一致的夏枯草果穗进行处理, 分别喷洒 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)、17.14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 吲哚乙酸(IAA)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 乙烯利(ETH)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 硝普钠(SNP)、1 mmol L^{-1} 无水氯化钙(CaCl_2)、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 水杨酸(SA)、2.88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 赤霉素(GA_3)。以喷洒前(0 h)的果穗为对照, 24 h 后采集处理组样品。

对夏枯草果穗、茎、叶及喷施 7 种外源物质的果穗中 *PvDXS* 基因相对表达量进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测, qPCR 检测的反应体系: 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10.0 μL , QN Rox Reference Dye 0.1 μL , 正反向引物均为 0.4 μL , 模板 cDNA 2.0 μL , RNase-Free Water 7.1 μL 至终体积为 20.0 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 20 s 后, 进行 40 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$, 1 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 s), 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 s。*actin* 基因 (KJ010818) 作为内参, 设计序列引物(表 1)。扩增完成后进行溶解曲线测定, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 *PvDXS* 相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *PvDXS* 基因克隆

依据夏枯草转录组测序数据设计引物，夏枯草 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板，PCR 扩增得到 1 条 2 000 bp 左右的片段。ORF Finder 软件分析克隆测序拼接所得序列的开放阅读框，结果所得序列含有 1 个大小为 2 181 bp 的完整开放阅读框，命名为 *PvDXS*。



注：1. *PvDXS* 基因 PCR 扩增产物；M. DNA 标准 Marker。

Note: 1. PCR amplification product of *PvDXS* gene ; M. DL2000 DNA Marker.

图 1 夏枯草 *DXS* 基因克隆

Fig.1 Cloning of *DXS* gene from *PVL*

2.2 *PvDXS* 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 理化性质

ExPASy Proteomics ServerProtparam 在线软件分析编码蛋白的理化性质。推测该蛋白编码 726 个氨基酸，理论分子量为 78040.47 D，等电点(pI)为 6.75。总原子数为 11 002，原子组成： $C_{3457}H_{5521}N_{959}O_{1035}S_{30}$ 。总负电荷残基数(Asp + Glu)有 77 个，总正电荷残基数(Arg + Lys)有 73 个，推测为酸性蛋白质。该蛋白中丙氨酸(Ala)含量最多(占氨基酸总数 9.5%)，其次是甘氨酸(Gly)(占氨基酸总数 9.2%)，半胱氨酸(Cys)的含量最少为 1.2%。通过对 *PvDXS* 蛋白进行疏水性预测，结果显示：*PvDXS* 蛋白疏水性表明多肽链第 183 位具有最低分值-2.522，第 710 位具有最高分值 2.332，疏水氨基酸的数量小于亲水氨基酸的数量，推测其为亲水性蛋白（图 2）。

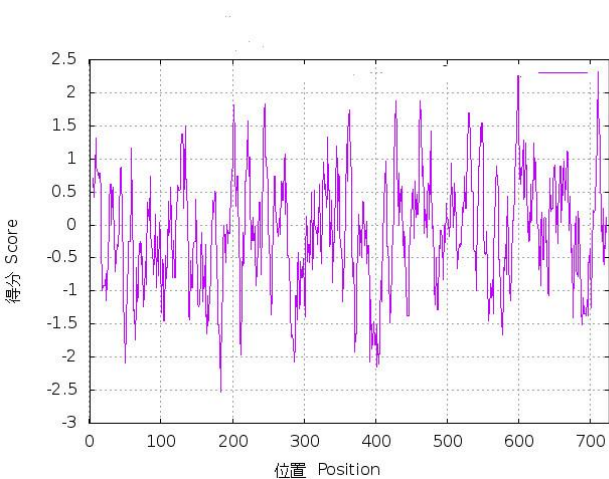


图 2 PvDXS 蛋白疏水性预测
Fig. 2 Prediction of hydrophobicity of PvDXS protein

2.2.2 亚细胞定位和功能域

通过亚细胞定位预测软件分析，发现 PvDXS 定位在叶绿体中。SMART 在线软件对 PvDXS 蛋白进行功能域预测，结果显示 PvDXS 蛋白具有 Transketolase_C 结构域和 Transket_pyr 结构域，分别位于第 583 位到 706 位、第 404 位到第 569 位，该蛋白功能域预测其含有与 IPP 结合的保守结构域(DXP_synthase_N)，这一结构与转酮酶及丙酮酸脱氢酶的 E1 亚基(E1_dh 家族)结构相似(Newman & Chappell,1999)，分别位于第 82 位到第 367 位、第 109 位到第 261 位。

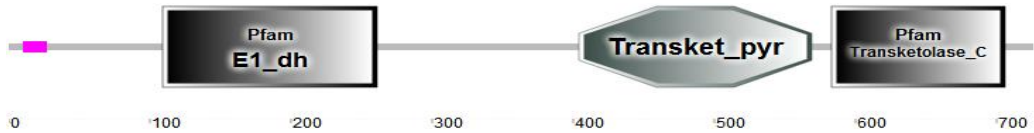
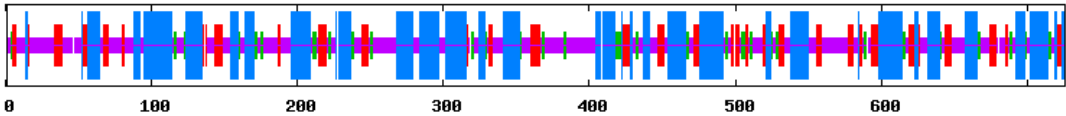


图 3 PvDXS 功能结构域预测
Fig. 3 PvDXS functional domain prediction

2.2.3 PvDXS 蛋白的二级及三级结构预测

利用 NPSA server 在线软件对 PvDXS 编码的蛋白进行二级结构分析，结果表明：该蛋白预测由 36.91%的 α -螺旋、19.7%的延伸链、10.33%的 β -转角和 33.06%的不规则卷曲组成混合型蛋白。Swiss-Model 在线软件预测蛋白三级结构，结果显示 PvDXS 与大肠杆菌 DXS 蛋白(2o1s.1.A)相似度达 49.11%。



注：蓝色. α 螺旋；红色. 延伸链；绿色. β 转角；橙色. 无规则卷曲。

Note: Blue. Alpha helix; Red. Extended strand; Green. Beta turn; Orange. Random coil.

图 4 PvDXS 蛋白二级结构预测

Fig. 4 Prediction of secondary structure of PvDXS protein

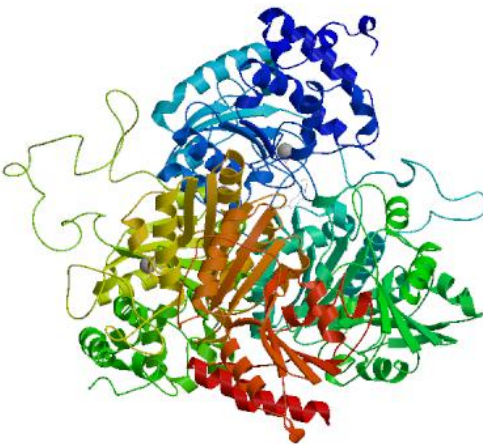


图 5 PvDXS 蛋白三级结构预测

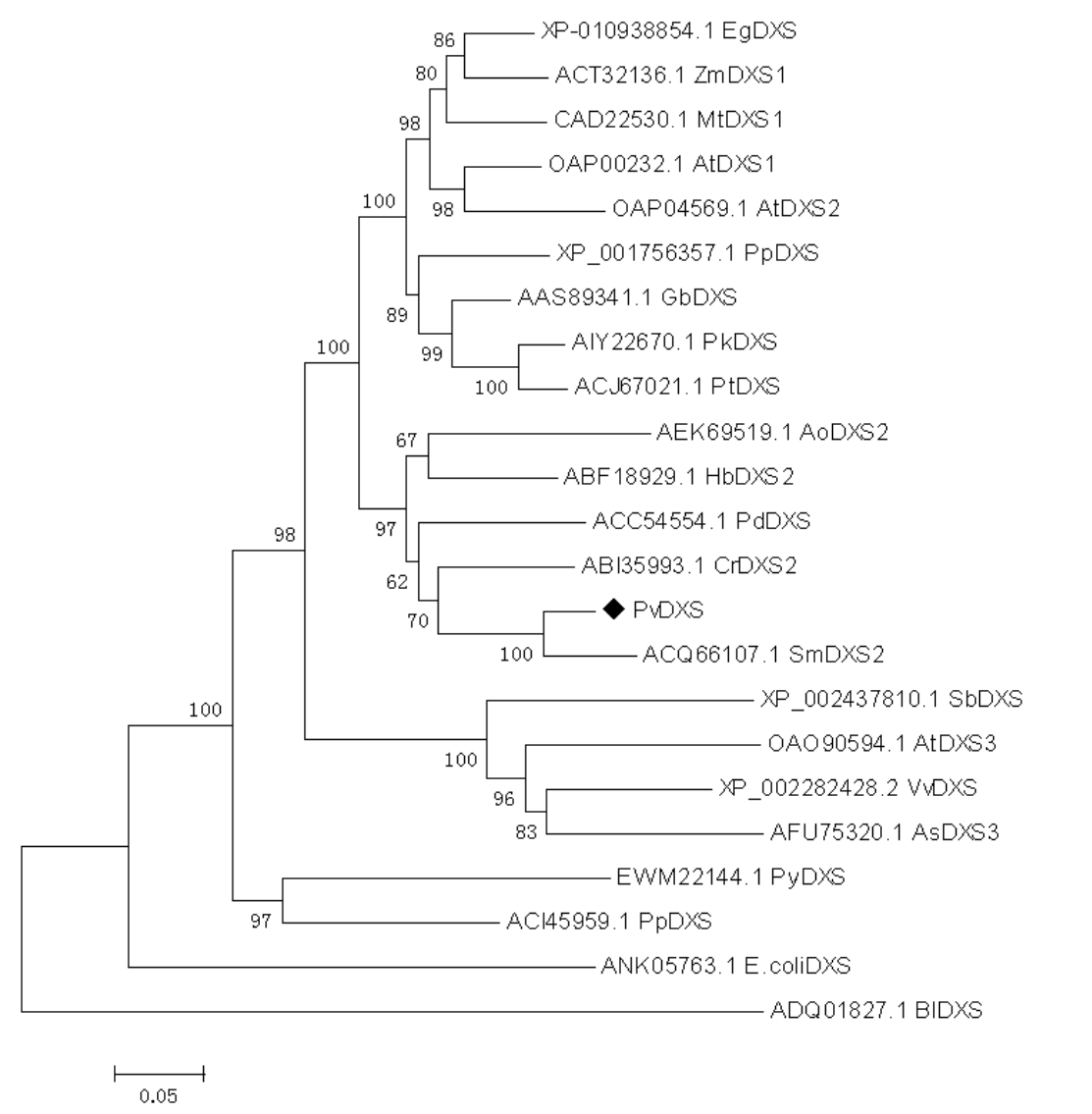
Fig.5 PvDXS protein tertiary structure prediction

2.2.4 系统进化树构建和多序列比对

通过 BLAST 序列比对,从 NCBI 数据库中下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AtDXS)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*, SmDXS)、长春花(*Catharanthus roseus*, CrDXS)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*, HbDXS)、苜蓿(*Medicago truncatula*, MtDXS)、玉米(*Zea mays*, ZmDXS)、土沉香(*Aquilaria sinensis*, AsDXS)、葡萄(*Vitis vinifera*, VvDXS)、高粱(*Sorghum bicolor*, SbDXS)、高良姜(*Alpinia officinarum*, AoDXS)、银杏(*Ginkgo biloba*, GbDXS)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*, PpDXS)、野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*, PvDXS)、油棕(*Elaeis guineensis*, EgDXS)、赤松(*Pinus densiflora*, PdDXS)、火炬松(*Pinus taeda*, PtDXS)、思茅松(*Pinus kesiya* var. *langbianensis*, PkDXS)、双歧杆菌(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBM68, BIDXS)和大肠杆菌(*Escherichia coli*, coliDXS)的 DXS 蛋白序列,与 PvDXS 蛋白的氨基酸序列通过 MEGA5.1 软件采用邻近法(N-J 法)构建系统进化树,并选取部分植物的氨基酸序列利用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析。

系统进化树结果表明, PvDXS 蛋白与丹参、长春花 DXS(SmDXS2、CrDXS2)亲缘关系较近,推测属于第 II 类 DXS 蛋白类型,这一类型的 DXS 蛋白参与次级代谢产物萜类物质的生物合成(Miziorko, 2011)。PvDXS 与 SmDXS 具有非常高的相似性,说明同一科植物基因在进化关系上具有高度保守性。多序列比对显示 PvDXS 蛋白与 HbDXS 蛋白具有较高的相似性,序列一致性达 73.76%,PvDXS 蛋白包含 1 个硫胺素焦磷酸结合位点:GDG (X)8E(X)

4A(X)11NDN 和 1 个转酮醇酶结构域：DRAGX28PXD；该蛋白存在于叶绿体中，N 端存在 1 段由 56 个氨基酸残基构成的质体转运肽（图 7）。

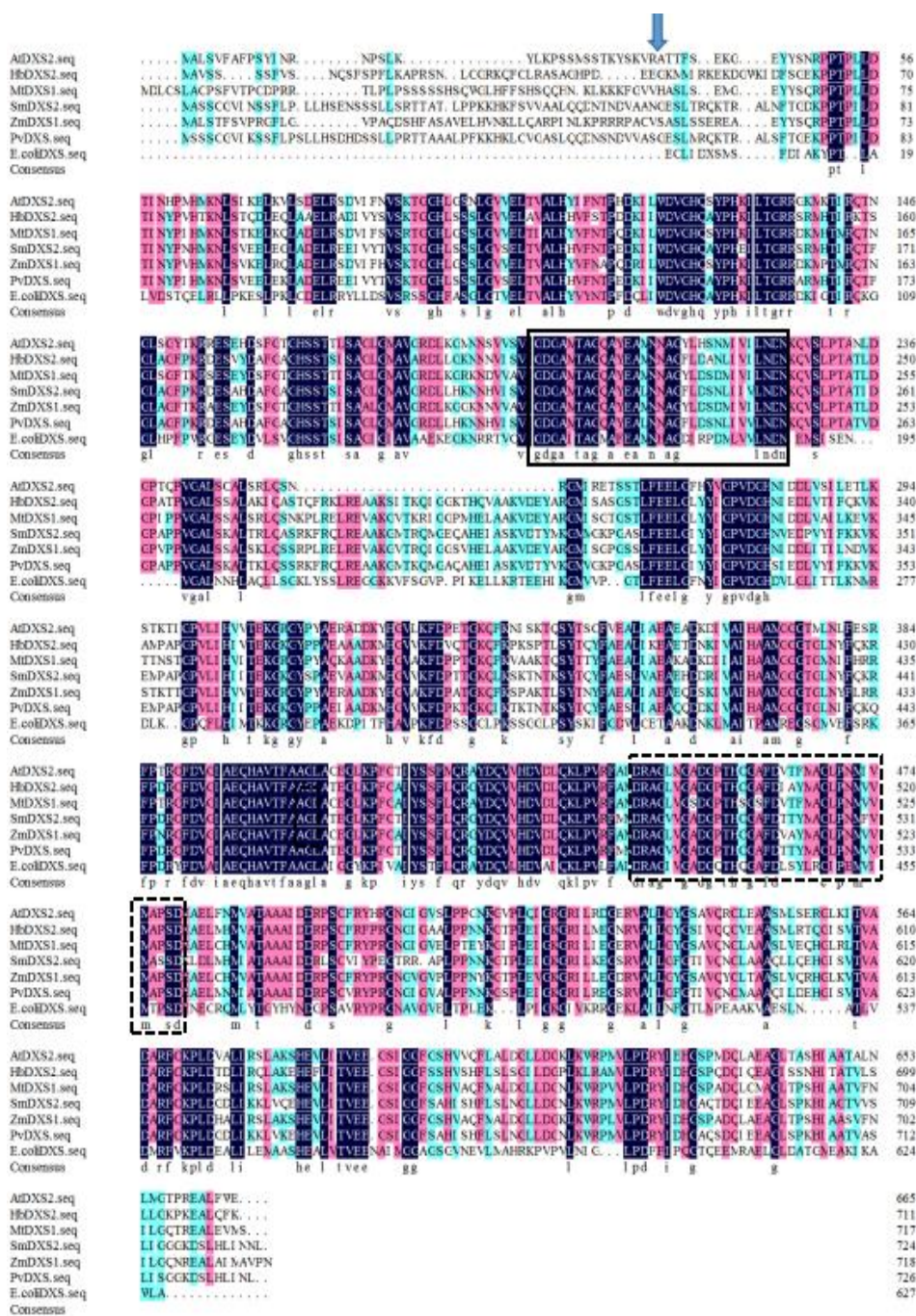


注：基因前面序列号为 NCBI 登录号。

Note: Previous gene sequence number is NCBI login number.

图 6 PvDXS 系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of PvDXS



注：实线框为二磷酸硫酸胺结合位点,虚线框为转酮醇酶结构域；箭头为质体转运肽切割位点。

Note: Solid frame is thiamine diphosphate binding site;Dotted frame is transketolase domain;Arrow is plastid transport peptide cleavage site.

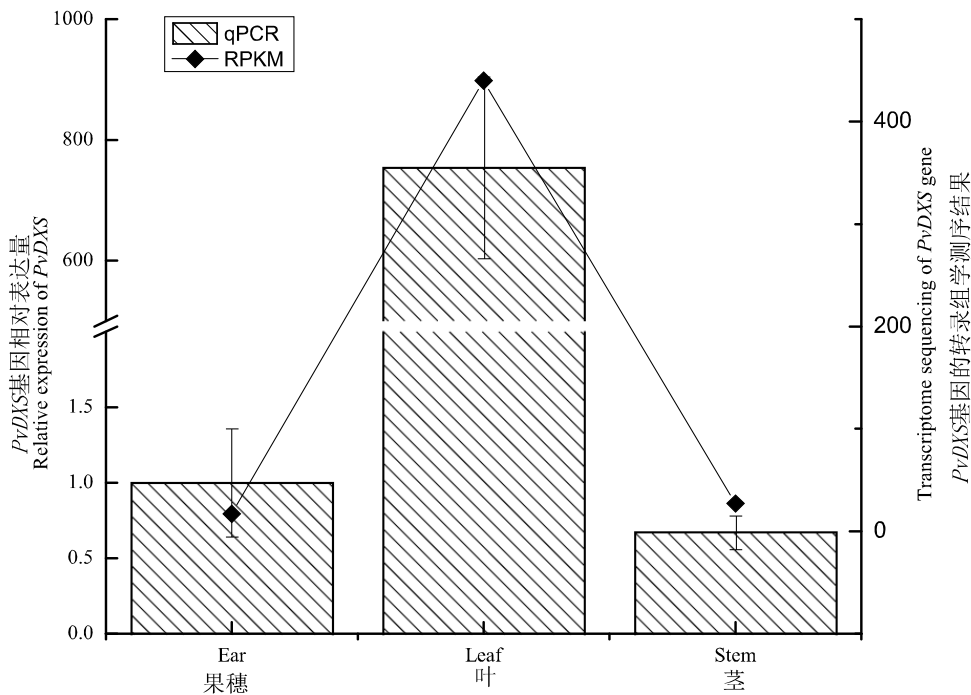
图 7 PvDXS 多序列比对

Fig.7 PvDXS multiple alignment of DXR amino acid sequences

2.3 组织特异性及外源性物质诱导后表达

利用 qRT-PCR 方法检测 *PvDXS* 基因在夏枯草果穗、叶和茎中的表达量，以果穗为对照

样品。结果显示 *PvDXS* 基因在 3 个样本中的表达量范围为 0.671~753.296。*PvDXS* 基因在叶中高表达，其次是果穗，茎中的表达量最低。*PvDXS* 基因在叶中的相对表达量是在果穗中的 753.2 倍，与课题组前期夏枯草转录组测序结果一致。



注：qPCR. 经过验证的基因相对表达量，RPKM. 转录组测序结果。

Note: Qpcr. Relative amount of proven gene expression, RPKM. Result of transcriptome sequencing.

图 8 *PvDXS* 基因的表达模式分析

Fig. 8 Analysis of expression patternof *PvDXS* gene

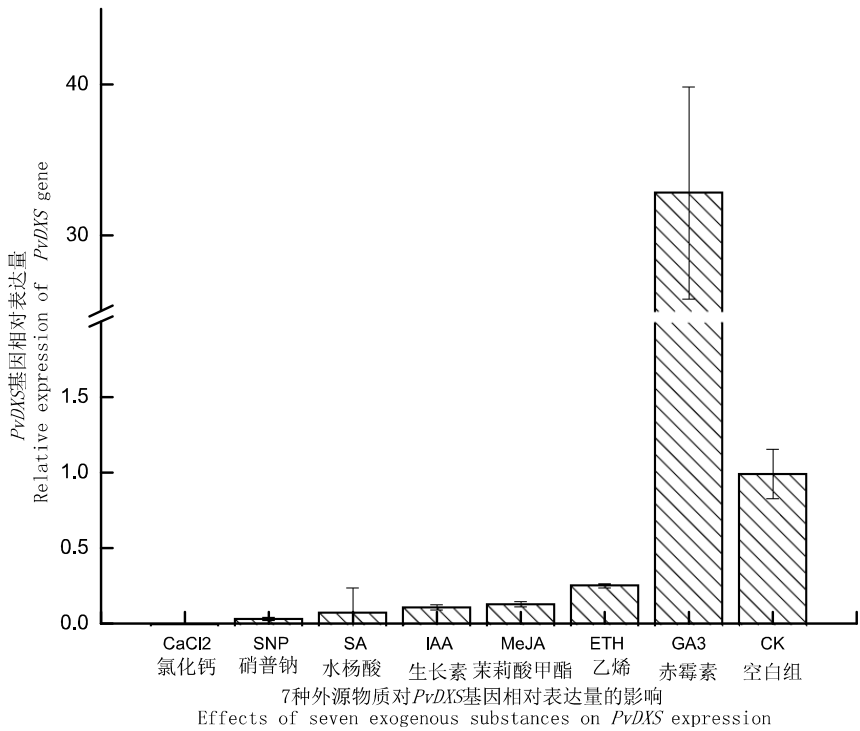


图 9 外源物质处理后 *PvDXS* 基因表达量

Fig. 9 *PvDXS* expression after treatment with exogenous substances

7 种外源性物质处理后分析夏枯草果穗中 *PvDXS* 基因的表达趋势。GA₃ 处理后 *PvDXS* 的表达量显著增高，为对照组的 32.8 倍。其他 6 种外源性物质处理后 *PvDXS* 表达量范围为 0.005~0.260，其中 CaCl₂、SNP 及 SA 处理后对该基因的表达具明显的抑制作用，其次是 IAA、MgJA 及 ETH 处理组。

3 讨论

萜类化合物是一种广泛存在于植物中的次生代谢产物，包括甾体类、醌类、胡萝卜素类和植物激素等，其参与多种植物生理代谢活动如光合和呼吸作用(Xiang et al., 2007)。DXS 在萜类化合物合成 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径中发挥关键作用，催化丙酮酸和 3-磷酸-甘油醛发生缩合反应形成途径中的重要中间体 DXP (Krushkal et al., 2003)。Zhou et al. (2016)发现丹参毛状根中过表达丹参 *Sm DXS1* 和 *Sm DXS2*，丹参酮的含量显著提高；穿心莲细胞 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 的悬浮体系培养 24 h 后，其产生的穿心莲内酯含量增加 5.25 倍，且与 *DXS* 基因的表达水平成正相关(Sharma et al., 2015)。拟南芥过量表达马铃薯 *St DXS1* 基因后植株的叶片中叶绿素和胡萝卜素的明显增加(Henriquez et al., 2016)。这均表明 *DXS* 是萜类化合物代谢途径的重要调节酶且利用其表达可改变萜类化

合物的含量。

研究表明 *DXS* 基因的表达具有组织特异性, 通常 *DXS* 基因在叶、茎的绿色细胞中表达较强, 其他的组织器官表达较弱(Sawitri & Wallie, 2005)。本研究利用 qPCR 技术对夏枯草叶、茎、果穗组织器官中 *PvDXS* 的表达特征进行分析。结果表明 *PvDXS* 基因在不同组织中均有表达, 但表达量差异较大。*PvDXS* 基因在叶中的表达水平最高, 且为果穗中表达量的 753.2 倍。

根据序列进化关系可将 *DXS* 基因分为 *DXS I*、*DXS II* 和 *DXS III* 三类(张浩宇等, 2018), 系统进化树分析显示 *PvDXS* 蛋白与丹参、长春花中的第 II 类 *DXS* 蛋白(*SmDXS2*、*CrDXS2*) 亲缘关系较近, 据此推测 *PvDXS* 属于第 II 类 *DXS* 蛋白。*DXSII* 蛋白可编码植物特定的次生代谢产物, 说明 *PvDXS* 与夏枯草活性成分(如萜类化合物)含量有关。大量研究表明 *DXS* 基因的表达量与其次生代谢产物含量成正相关, 如 Munoz-Bertomeu et al. (2016) 报道了在薰衣草中过量表达拟南芥 *DXS* 基因显著增加转基因植株叶片和花中精油的含量。 GA_3 处理后 *PvDXS* 的表达量显著增高, 为对照组的 32.8 倍。其他 6 种外源性物质处理后 *PvDXS* 对该基因的表达具明显的抑制作用。Gong et al. (2006) 施加 MeJA 和 ASA 等外源物质后, 发现银杏内酯的合成与 *GbDXS* 表达呈正相关。Murcia et al. (2016) 对葡萄喷施 GA_3 后其糖分及萜类化合物显著增加, 推测 GA_3 可提高的夏枯草中次生代谢产物如萜类化合物。此外, 孙君等研究发现双瓣茉莉 *JsDXS* 的表达量受生物钟的调控, 具有昼夜节律性(孙君等, 2014)。其他 6 种外源物质对 *PvDXS* 表现出一定抑制作用可能与此有关。本研究丰富 MEP 途径中 *DXS* 基因的种类, 为后期的基因功能研究奠定了基础。

参考文献:

- GONG YF, LIAO ZH, GUO BH, et al., 2006. Molecular cloning and expression profile analysis of Ginkgo biloba DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway[J]. Planta Med, 72: 329-335.
- HENRIQUEZ MA, SOLIMAN A, LI G, et al., 2016. Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (Solanum tuberosum) 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 1 (StDXS1) in response to Phytophthora infestans[J]. Plant Sci, 243:71-83.
- JADAUM JS, SANGWAN NS, NAMOLIYA LK, et al., 2017. Over-expression of DXS gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented geranium and withania somnifera: active involvement of plastid Isoprenogenic pathway in their biosynthesis[J]. Physiol Plant, 159(4):381-400.
- KRUSHKAL J, PISTILLI M, FERRELL KM, et al., 2003. Computational analysis of the evolution of the structure and function of 1-deoxy-D-xylulose-1-deoxy-D-xylulose-5-

- phosphate synthase, a key regulator of the mevalonate-independent pathway in plants [J]. *Gene*, 313(12): 127-138.
- MIZIORKO HM, 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 505(2):131-143.
- MUNOZ-BERTOMEU J, ARRILLAGA I, ROS R, et al., 2006. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender[J]. *Plant Physiol*, 142: 890-900
- MURCIA G, FONTANA A, PONTIN M, et al., 2016. ABA and GA₃ regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine[J]. *Phytochem*, 135:34-52.
- NEWMAN JD, CHAPPELL J, 1999. Isoprenoid biosynthesis in Plant: Carbon Partitioning within the cytoplasmic pathway[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34(2): 95-106.
- QUEROL J, BESUMBES O, LOIS LM, et al., 2001. A fluorometric assay for the determination of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase activity[J]. *Anal Biochem*, 296(1):101-105.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION M, BORONAT A, 2015. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 25:17-22.
- SAWITRI K, WALLIE S, 2005. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-Phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq[J]. *Plant Sci.*, 169: 571-578.
- SHARMA SN, JHZ Z, SINHA RK, et al., 2015. Jasmonate-induced biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata*[J]. *Physiol Plant*, 153: 221-229.
- SUN J, CHEN GX, YE NX, et al., 2014. Cloning and expression analysis of deoxyxylulose-5-phosphate synthase gene related to aroma from *Jasminum sambac* and isolation of its promoter[J]. *Acta Hort Sin*, 41 (06): 1236-1244.[孙君, 陈桂信, 叶乃兴, 等, 2014. 茉莉花香气相关基因及其启动子的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 41(06):1236-1244.]
- SUN R, LIU S, GAO JL, et al., 2014. Cloning and expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose -5-phosphate synthase gene from the medicinal plant *Conyza blinii* H. Lev[J]. *Turk J Biol*, 38:664-670.
- WANG LJ, FANG X, YANG CQ, et al., 2013. Terpene secondary metabolism and its regulation in plants[J]. *Chin Sci: Life Sci*, 43 (12): 1030-1046.[王凌健, 方欣, 杨长青, 等, 2013. 植物萜类次生代谢及其调控[J]. *中国科学:生命科学*, 43(12):1030-1046.]
- XIANG S, USUNOW G, LANGE G, et al., 2007. Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 282(4): 2676-2682.
- ZHANG HY, FAN JM, WANG T, et al., 2018. Advances on key gene *DXS* involved in the terpenoid biosynthesis in plants. *Biotechnology Bulletin*, 34(3):1-8.[张浩宇, 樊俊苗, 王婷等, 2018.植物萜类合成关键基因 *DXS* 研究进展[J]. *生物技术通报*, 34(3):1-8.]
- ZHOU W, HUANG FF, LI S, et al., 2016. Molecular cloning and characterization of two 1-deoxy-D- xylulose-5-phosphate synthase genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Mol Breed*, 36 (9) :124-136.